

Helsinki 29.10.1998

PCT/

199/00860

REC'D 16 DEC 1999

WIPO

PCT

ETUOIKEUSTODISTUS
PRIORITY DOCUMENT

1199/000



Hakija
Applicant

Valio Oy
Helsinki

Patenttihakemus nro
Patent application no

982114

Tekemispäivä
Filing date

30.09.1998

Kansainvälinen luokka
International class

A23L

Keksinnön nimitys
Title of invention

"Menetelmä proteiinipitoisen materiaalin käsittelemiseksi ja näin saatu materiaali ja sen käyttö"

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Täten todistetaan, että oheiset asiakirjat ovat tarkkoja jäljennöksiä patentti- ja rekisterihallitukselle alkuaan annetuista selityksestä, patenttivaatimuksista ja tiivistelmästä.

This is to certify that the annexed documents are true copies of the description, claims and abstract originally filed with the Finnish Patent Office.


Pirjo Kaila
Tutkimussihteeri

Maksu 300,- mk
Fee 300,- FIM

Osoite: Arkadiankatu 6 A Puhelin: 09 6939 500
P.O.Box 1160 Telephone: + 358 9 6939 500
FIN-00101 Helsinki, FINLAND

Telefax: 09 6939 5204
Telefax: + 358 9 6939 5204

Menetelmä proteiinipitoisen materiaalin käsittelemiseksi ja näin saatu materiaali ja sen käyttö

Keksinnön kohteena on menetelmä proteiinipitoisen materiaalin
5 käsittelemiseksi, täsmällisemmin esitettynä menetelmä naudan insuliinin
poistamiseksi lehmänmaidosta peräisin olevasta nestemäisestä rasvattomasta
proteiinipitoisesta materiaalista. Lisäksi keksinnön kohteena on kyseisellä
menetelmällä saatu, oleellisesti naudaninsuliiniton proteiinipitoinen materiaali ja
sen käyttö äidinmaidonkorvikkeen tai jonkin muun erityisravintovalmisteen
10 proteiiniosana tai kulutusmaidon, muiden maitojuomien tai erilaisten maito-
valmisteiden raaka-aineena. Kyseisten tuotteiden valmistuksessa proteiiniosana
voidaan käyttää keksinnön mukaisesti saatua, oleellisesti naudaninsuliinitonta,
lehmän maidosta peräisin olevaa rasvatonta proteiinipitoista materiaalia.

Keksinnön mukaisesti saatu, oleellisesti naudaninsuliiniton, lehmän
15 maidosta peräisin oleva rasvaton proteiinipitoinen materiaali, edullisesti hera
sopii erinomaisesti edellä mainittujen tuotteiden proteiiniosaksi, koska keksinnön
mukainen käsittely ei oleellisesti muuta tuotteen makua.

Insuliinipuutoksesta johtuva diabetes mellitus (IDDM) on sairaus,
jossa haiman Langerhansin saarekkeiden insuliinia tuottavat beeta-solut ovat
20 tuhoutuneet, mutta saarekkeiden muut solut säilyvät vahingoittumattomina
(Castano L. ja Eisenbarth GS. Annu. Rev. Immuno., 8 (1990) 647 - 79).

Sekä perintö- että ympäristöllisten tekijöiden uskotaan vaikuttavan
lasten IDDM riskiin. Perinnöllinen tekijä on tärkeä, mutta ei riittävä selittämään
IDDM:n kehittymistä. Elinaikainen IDDM:n riski on vain 30 - 50 % toisella
25 monotsygoottisista kaksosista, kun toisella kaksosista on IDDM. Vain 10 %
uusista IDDM-tapauksista esiintyy perheissä, joissa on IDDM, ja 90 % uusista
tapauksista diagnosoidaan potilailla, joilla ei ole perhetaustassa IDDM:ää. Tämä
tarkoittaa, että ympäristötekijöillä voi olla jopa tärkeämpi merkitys IDDM:n
kehittymisessä kuin perintötekijöillä.

30 Altistumisen lehmän maidon proteiineille imeväisaikana on todettu
lisäävän IDDM:n riskiä useissa epidemiologisissa tutkimuksissa (Gerstein H.,
Diabetes Care 17 (1994) 13 - 19). Epidemiologisten havaintojen perusteella on
esitetty useita hypoteesejä mekanismeista, joilla lehmän maidon proteiinit
voisivat toimia diabetogeenisinä tekijöinä. Viimeisimpiä on hypoteesi, jonka
35 mukaan lehmän maidon sisältämä insuliini voi aiheuttaa immuunivasteen, joka

virheellisesti kohdistuu lapsen omaa insuliinituotantoa vastaan (Vaarala, O., Paronen, J., Otonkoski, T., Åkerblom, H.K., Scand. J. Immunol. 47 (1998) 131 - 135).

Suun kautta annettava heterologinen insuliini, joka vähäisessä
 5 määrin eroaa autologisesta insuliinista, saattaa rikkoa immuunitoleranssin beeta-soluja kohtaan. Insuliinia tunnistavien lymfosyyttien muodostuminen saattaa olla haitallista henkilöille, joilla on perinnöllinen alttius IDDM:ää kohtaan, ja tämän lymfosyyttipopulaation aktivoiminen jopa myöhemmin elämässä saattaa johtaa autoimmuunihyökkäykseen insuliinia tuottavia beeta-soluja
 10 kohtaan. Olemme osoittaneet, että äidinmaidonkorvikkeen antaminen imeväisikäiselle saa aikaan vasta-ainetuotannon naudan insuliinia kohtaan (Vaarala, O., Paronen, J., Otonkoski, T., Åkerblom, H.K., Scand. J. Immunol. 47 (1998) 131 - 135). Nämä vasta-aineet ristireagoivat humaani-insuliinin kanssa. Koska insuliiniautovasta-aineiden (IAA) esiintyminen edeltää ja ennustaa
 15 IDDM:n puhkeamista, immunisoituminen insuliinille maitotuotteista voi olla haitallista ja lisätä IDDM:ään sairastumisriskiä. Maitotuotteita, jotka eivät sisällä immunoreaktiivista naudan insuliinia, voitaisiin siten pitää ei-diabetogeenisinä ravintovalmisteina.

Mikäli autoimmunisaation käynnistävä tekijä on naudan insuliini, jota
 20 esiintyy pieniä määriä lehmän maidossa, on sen poistaminen äidinmaidonkorvikkeista erittäin tärkeää IDDM:n välttämiseksi lapsilla. Tästä syystä on tarve saada markkinoille lehmänmaitotuotteita ja lehmänmaitopohjaisia tuotteita, jotka eivät sisällä immunoreaktiivista naudan insuliinia. Tämä koskee erityisesti äidinmaidonkorvikkeita, jotka ovat ensimmäisiä pienten lasten nauttimia lehmän-
 25 maitopohjaisia tuotteita. Lisäksi se koskee muitakin erityisravintovalmisteita sekä erilaisia maitojuomia ja maitovalmisteita, kuten jäätelöä, jogurttia ja juustoja.

Lisäksi olisi toivottavaa, että tuotteissa käytettävä proteiiniosa ei oleellisesti muuttaisi tuotteiden totuttua makua.

Aiemmin olemme osoittaneet, että naudan insuliinin poistaminen
 30 voidaan tehdä lehmänmaidosta peräisin olevasta rasvattomasta proteiinipitoisesta materiaalista, kuten herasta tai rasvattomasta maidosta kationinvaihdon ja sen jälkeisen mahdollisen hydrolyysin ja hydrolyysin jälkeisen mahdollisen kromatografiakäsittelyn avulla, joka voi olla esimerkiksi adsorptiohartsikäsittely (FI-patenttihakemus 971872). Myös FI-patenttissamme 94089 on kuvattu pro-
 35 teiinihydrolysaatin adsorptiohartsikäsittely.

Nyt on yllättäen todettu, että naudan insuliini voidaan poistaa lehmänmaidosta peräisin olevasta nestemäisestä rasvattomasta proteiinipitoisesta materiaalista, kuten herasta tai rasvattomasta maidosta suoraan adsorptiohartsikäsittelyn avulla. Tämä uusi menetelmä poistaa naudan insuliinin aiempaa
5 täydellisemmin ja taloudellisemmin kyseisestä proteiinipitoisesta materiaalista.

Uudessa menetelmässä ei myöskään tarvita proteiinin hydrolyysiä. Näin vältetään hydrolyysivaiheen aiheuttamilta lisäkustannuksilta sekä hydrolyysin tuotteista johtuvalta tuotteen maun muuttumiselta. Hydrolyysin tuotteina saadaan pilkkoutuneita proteiineja, jotka muuttavat valmistettavan tuotteen
10 makua totutusta. Esimerkiksi maito, jonka proteiiniosa on ainakin osittain korvattu hydrolysoidulla ja siten pilkkoutuneita proteiineja sisältävällä heralla, ei ole maidon makuista. Sitä vastoin maito, jonka proteiiniosa on ainakin osittain korvattu keksinnön mukaisella menetelmällä käsitellyllä, kokonaisia proteiineja sisältävällä heralla, on oleellisesti maidon makuista.

15 Lehmän maito sisältää normaalisti pieniä määriä naudan insuliinia. Pitoisuus vaihtelee määritysmenetelmästä riippuen, mutta esimerkiksi sekä ELISA-menetelmällä (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) että RIA-menetelmällä (Radio Immuno Assay) on todettu n. 1 ng/ml pitoisuuksia.

Tämän keksinnön yhteydessä naudan insuliini analysoitiin näytteistä
20 RIA-menetelmän avulla. Näyteliuos pakkaskuivattiin, liuotettiin konsentroiduksi liuokseksi ja määritettiin RIA:lla. Toisena riippumattomana menetelmänä käytettiin ELISA-menetelmää, jossa käytettävät vasta-aineet olivat toisia kuin RIA-menetelmässä. RIA-analyysi pitää tehdä ennen lämpökäsittelyä luotettavan tuloksen saamiseksi. RIA- ja ELISA-menetelmät antoivat samaa suuruusluokkaa
25 olevia tuloksia.

Insuliinin puhdistuksessa tuotanto- tai uuttoliuoksista on perinteisesti käytetty nestekromatografiaa ja käänteisfaasikolonnia (Kroeff et al., J. Chromatogr. 461 (1989) 45 - 61; Poll ja Harding, J. Chromatogr. 539 (1991) 37 -
30 45; Cox, J. Chromatogr. 599 (1992) 195 - 203; Welinder, J. Chromatogr. 542 (1991) 83 - 99), geelisuodatus- tai anioninvaihtokolonnia (WO 90/00176 ja WO 90/00177) tai heikkoa kationinvaihtokolonnia (DE 3511270 A1 ja GB 2173503A). Mikään julkaisu ei ole toistaiseksi käsitellyt naudan insuliinin eristämistä suoraan rasvattomasta maidosta tai herasta lukuunottamatta edellä mainittua FI-patenttihakemustamme 971872. Käänteisfaasi- tai geelisuodatus-
35 kromatografia eivät sellaisenaan sovi maidon käsittelyyn, sillä käsitellyn maidon olisi oltava elintarvikekelpoista ja kohtuullisen hintaista.

Insuliini on immunologisesti inaktivoitavissa helposti lämpökäsittelyllä. Esimerkiksi pastörinti- (72 °C) ja korkeakuumennuskäsittelyt (UHT-käsittely, 135 - 140 °C) inaktivoivat suuren osan insuliinista RIA:lla havaitsemattomaan muotoon. Kuitenkin on havaittu, että äidinmaidonkorvikkeita saaneet lapset ovat immunisoituneet naudan insuliinille äidinmaidonkorvikkeiden kautta (Vaarala, O., Paronen, J., Otonkoski, T., Åkerblom, H.K., Scand. J. Immunol. 47 (1998) 131 - 135), joiden tuotteiden valmistuksen kuumennusvaiheissa suuri osa insuliinista on muuttunut RIA:lla havaitsemattomaksi.

Hakija on nyt keksinyt, miten naudan insuliini saadaan aikaisempaa paremmin poistetuksi lehmänmaidosta peräisin olevasta nestemäisestä rasvattomasta proteiinipitoisesta materiaalista. Tällöin saadaan kohtuullisin kustannuksin lehmänmaidosta peräisin oleva, elintarvikekelpoinen proteiini-koostumus, joka on oleellisesti naudaninsuliiniton ja joka sellaisenaan sopii erityisesti äidinmaidonkorvikkeen, mutta myös muiden erityisravintovalmisteiden proteiiniosaksi tai kulutusmaidon, muiden maitojuomien tai erilaisten maitovalmisteiden, kuten jäätelön, jogurtin tai juuston raaka-aineeksi muuttamatta niiden makua totutusta.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle naudan insuliinin poistamiseksi lehmänmaidosta peräisin olevasta nestemäisestä rasvattomasta proteiinipitoisesta materiaalista on tunnusomaista, että

lehmänmaidosta peräisin oleva nestemäinen rasvaton proteiinipitoisen materiaali, jonka pH on 2 - 8, saatetaan lämpötilassa, joka on alle 65 °C, kosketukseen adsorptiohartsin kanssa, jolloin käsiteltävän proteiinipitoisen materiaalin painosuhde adsorptiohartsiin on korkeintaan 100:1,

johon hartsikäsittelyyn mahdollisesti yhdistetään ainakin yksi proteiinipitoisen materiaalin ultra- ja diasuodatuskäsittely, ja näin saatu nestemäinen materiaali tarvittaessa konsentroidaan proteiinikonsentraatiksi ja mahdollisesti kuivataan jauheeksi.

Kun maidosta poistetaan rasva ja kaseiini, saadaan hera, joka sisältää heraproteiinit. Maidon kokonaisproteiinista noin 20 prosenttia on heraproteiineja ja loppu on kaseiinia. Juustonvalmistuksen yhteydessä saatavaa heraa kutsutaan juustoheraksi ja kaseiininvalmistuksen yhteydessä saatavaa heraa puolestaan kutsutaan kaseiiniheraksi.

Keksintö soveltuu parhaiten heran käsittelyyn. Keksinnössä käytetty hera voi olla mikä tahansa lehmänmaidosta peräisin oleva hera, kuten

esimerkiksi juustohera, juoksetekaseiinihera, happokaseiinihera tai hapan juustohera. Edullisesti hera on juustohera.

Lehmänmaidosta peräisin oleva rasvaton proteiinipitoinen materiaali voi olla myös ultra- ja diasuodatettua heraa eli heraproteiiniivistettä. Tällöin hartsilla käsiteltävä nestetilavuus on pienempi ja naudan insuliinin poistumisaste samaa luokkaa kuin heran käsittelyssä.

Edellä mainittujen lisäksi keksinnössä voidaan käyttää lehmänmaidosta peräisin olevana rasvattomana proteiinipitoisena materiaalina rasvatonta maitoa tai rasvattomasta maitojauheesta tehtyä vesiliuosta tai maidon kaseiinista tehtyä vesiliuosta, ts. kaseiiniliuosta. Tällöin naudan insuliinin poistumisaste ei kuitenkaan ole samaa luokkaa kuin heran käsittelyssä.

Keksinnön mukaisesti naudan insuliini poistetaan lehmänmaidosta peräisin olevasta nestemäisestä rasvattomasta proteiinipitoisesta materiaalista, edullisesti herasta tai heraproteiiniivisteestä saattamalla käsiteltävä materiaali kosketukseen adsorptiohartsin kanssa. Adsorptiohartsina, johon naudan insuliini sitoutuu, voidaan sopivasti käyttää styreeni- tai akryylipohjaista adsorptiohartsia, joka edullisesti on makrohuokoista. Esimerkkejä sopivista adsorptiohartseista ovat Dowex XUS 40285.00 (huokoskoko noin 50 Å; valmistaja Dow Inc., Saksa) ja Amberlite XAD 7 (huokoskoko noin 450 - 500 Å; valmistaja Rohm & Haas, Ranska).

Adsorptiohartsikäsitteily voidaan tehdä joko siten, että käsiteltävä proteiinipitoinen materiaali johdetaan adsorptiohartsilla täytetyn pylvään läpi, tai siten, että mainittu proteiinipitoinen materiaali saatetaan kosketukseen adsorptiohartsin kanssa sekoitusastiasa. Adsorptiohartsikäsitteilyssä pH on 2 - 8, sopivasti 4 - 6,7 ja lämpötila on alle 65 °C, yleensä 2 - 30 °C ja sopivasti 2 - 10 °C.

Kun adsorptiohartsikäsitteily tehdään pylväässä, pylväs täytetään adsorptiohartsilla, joka regeneroidaan sopivasti NaOH:lla ja HCl:llä. Käsiteltävä proteiinipitoinen materiaali johdetaan adsorptiohartsilla täytetyn pylvään läpi virtausnopeudella 1 - 20 pylvääntilavuutta (BV)/h, sopivasti virtausnopeudella 6 - 8 BV/h. Kyseisessä hartsikäsitteilyssä käsiteltävän proteiinipitoisen materiaalin painosuhde adsorptiohartsiin on korkeintaan 100:1, sopivasti 10:1 - 40:1.

Silloin kun adsorptiohartsikäsitteily tehdään sekoitusastiasa, edellä kuvatulla tavalla regeneroitu adsorptioharts ja käsiteltävä proteiinipitoinen

materiaali johdetaan sekoitusastiaan, jossa ne saatetaan kosketukseen toisensa kanssa sopivasti lievässä sekoituksessa. Kyseisessä hartsikäsittelyssä käsiteltävän proteiinipitoisen materiaalin painosuhde adsorptiohartsiin on korkeintaan 100:1, sopivasti 10:1 - 40:1 ja kosketusaika on alle 2 tuntia, sopivasti 5 60 minuuttia.

Edellä kuvattuun adsorptiohartsikäsittelyyn voidaan yhdistää ainakin yksi lehmänmaidosta peräisin olevan, nestemäisen rasvattoman proteiinipitoisen materiaalin ultra- ja diasuodatuskäsittely. Ultra- ja diasuodatuksella nestemäinen materiaali voidaan konsentroida kuivausta tai muuta jatkokäsittelyä varten, mutta samalla ultra- ja diasuodatuksella voidaan täydentää nautan insuliinin poistamista käsiteltävästä materiaalista. Ultra- ja diasuodatuksessa käytetään puoliläpäiseviä 5 000 - 25 000 D cut-off -kalvoja, sopivasti 10 000 D cut-off -kalvoja. Ultrasuodatuksessa sopivia kalvomateriaaleja ovat mm. polysulfoni, polyeetterisulfoni ja hydrofiilisesti pinnoitetut materiaalit.

Ultra- ja diasuodatuksella saavutettava insuliinin poistoaste kasvaa konsentrintisuhteen noustessa. Konsentrintisuhteeksi valitaan kulloinkin tarkoituksenmukainen suhde.

Hera tai jokin muu laimea lähtömateriaali voidaan konsentroida edellä mainitulla ultra- ja diasuodatuksella vastaavasti heraproteiiniitiivisteeksi tai muuksi konsentroiduksi lähtöaineeksi ennen edellä mainittua adsorptiohartsikäsittelyä. Toisaalta kyseinen ultra- ja diasuodatuskäsittely voidaan tehdä edellä mainitun adsorptiohartsikäsittelyn jälkeen, jolloin saadaan proteiinin-konsentraatti, joka voidaan kuivata jauheeksi, sopivasti sumutus- tai pakkaskuivauksella.

Lähtöaineen käsittelyssä kokonaiskonsentrintisuhde voi olla esimerkiksi noin 24 (konsentrintisuhde ensin 6 ja sitten 4), mutta materiaalin konsentroinnissa proteiini konsentraatiksi kokonaiskonsentrintisuhde voi olla esimerkiksi noin 120 (konsentrintisuhde ensin 10 ja sitten 12).

Keksinnön mukaisen menetelmän edullisessa suoritusmuodossa ultra- ja diasuodatus tehdään ennen adsorptiohartsikäsittelyä ja/tai adsorptiohartsikäsittelyn jälkeen.

Ennen saattamista kosketukseen adsorptiohartsin kanssa lehmänmaidosta peräisin oleva nestemäinen rasvaton proteiinipitoinen materiaali, edullisesti hera voidaan esikäsitellä kirkastamalla se lämpötilassa, joka on alle 65 °C, sopivasti mikrosuodattamalla, ultrasuodattamalla tai sentrifugoimalla.

Edullisesti kyseinen esikäsittely tehdään suodattamalla käsiteltävä materiaali mikrosuodatuskalvojen läpi, jotka kalvot ovat 0,05 - 1,4 mikrometrin kalvoja, edullisesti 0,1 mikrometrin kalvoja. Tällöin erityisesti herasta saadaan poistettua mahdollisesti läsnäoleva kaseiinipöly tai denaturoituneet heraproteiinit, joiden mukana on osa suurikokoisista proteiineista, joihin insuliini on usein tarttunut. Ultrasuodatuksessa puolestaan voidaan käyttää kalvoja, joiden cut-off -arvo on 50 000 - 200 000 D, ja sentrifugoinnissa kierrosnopeus on edullisesti 1 000 - 10 000 kierrosta/min.

Myös kirkastuskäsittely alentaa hieman käsiteltävän materiaalin naudan insuliinipitoisuutta. Esimerkiksi heran naudaninsuliinipitoisuus alenee edellä mainitussa kirkastuskäsittelyssä 6 - 10 %.

Keksinnön edullisimmassa suoritusmuodossa heraa käsitellään adsorptiohartsilla ja tähän hartsikäsittelyyn yhdistetään yksi ultra- ja diasuodatuskäsittely, joka tehdään joko ennen hartsikäsittelyä tai sen jälkeen. Tutkimuksissa todettiin, että kyseisellä tavalla menetellen naudan insuliini voitiin poistaa herasta käsittelemällä juusto- tai kaseiiniheraa adsorptiohartsilla, kuten Dowex XUS 40285.00 (Dow Inc., Saksa) tai Amberlite XAD 7 (Rohm & Haas, Ranska). Ajamalla heraa pH 2 - 8:ssa NaOH:lla ja HCl:llä regeneroidun adsorptiohartsin läpi insuliini saatiin sitoutumaan hartsiin. Näin käsitelty hera ultrasuodatettiin pH 6,5:ssä heraproteiinikonsentraatiksi, joka haihdutettiin ja kuivatettiin jauheeksi. Käsittely tehtiin myös siinä järjestyksessä, että hera ensin ultra- ja diasuodatettiin ja saatu proteiiniitivistä käsiteltiin adsorptiohartsilla. Käsittelyssä heran insuliinipitoisuus aleni RIA:lla määritettynä 21:sta 3:een ng/g proteiinia eli n. 85 % proteiiniin suhteutettuna.

Edellä kuvatulla tavalla käsitelty hera tuotti heraproteiinivalmisteeseen, joka oli naudan insuliinin suhteen ratkaisevasti puhtaampi kuin vastaava perinteinen äidinmaidonkorvikejauhe (n. 22 - 30 ng/g proteiinia), maitojauhe (n. 30 ng/g proteiinia) tai ultra- ja diasuodatettu heraproteiinijauhe (proteiinipitoisuus 70 - 80 %) (15 - 25 ng/g proteiinia). Näin saatu oleellisesti naudan insuliinista vapaa heraproteiinivalmiste sopii äidinmaidonkorvikkeiden raaka-aineeksi ja ainoaksi proteiinilähteeksi, sillä heraproteiini on ravitsemuksellisesti erittäin korkealaatuista eikä tarvitse muita proteiineja ravintoarvon täydentämiseksi. Lisäksi keksinnön mukaisesti saatu, oleellisesti naudaninsuliiniton proteiinipitoinen materiaali sopii raaka-aineeksi ja proteiiniosaksi erilaisiin erityisravintovalmisteisiin, erilaisiin maitojuomiin, kuten kulutusmaitoon sekä erilaisiin muihin maitovalmisteisiin, kuten jäätelöön, jogurttiin ja juustoon.

Äidinmaidonkorvikkeet, jotka ovat ensimmäisiä pienten lasten nauttimia lehmänmaitopohjaisia tuotteita, koostetaan perinteisesti maidosta, kermasta, kasviöljystä, vähäsuolaisesta herajauheesta, kivennäisistä ja vitamiineista, joista maito, kerma ja vähäsuolainen herajauhe sisältävät naudan insuliinia.

Keksinnön mukaisen menetelmän avulla sekä äidinmaidonkorvikkeiden että muiden lehmänmaitopohjaisten erityisravintovalmisteiden, maitojuomien ja muiden maitovalmisteiden sekä näiden raaka-aineiden naudan insuliinipitoisuutta voidaan oleellisesti alentaa.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle oleellisesti naudaninsuliinittoman äidinmaidonkorvikkeen tai jonkin muun erityisravintovalmisteen tai kulutusmaiton, jonkin muun maitojuoman tai jonkin maitovalmisteen tai näiden raaka-aineen valmistamiseksi on tunnusomaista, että tuotteen valmistuksessa proteiini-
 15 naudaninsuliinitonta, lehmän maidosta peräisin olevaa rasvatonta proteiinipitoista materiaalia.

Keksintöä kuvataan lähemmin seuraavissa esimerkeissä.

Esimerkki 1

Naudan insuliinin poisto herasta makrohuokoisella styreenipohjaisella
 20 adsorptiohartsilla Dowex XUS 40285.00 pH:ssa 5,8.

XUS 40285.00 -adsorptiohartsia regeneroitiin 2 % NaOH:lla + 2 % HCl:lla, huuhdeltiin neutraaliksi ja pakattiin 20 ml pylvääseen. Pylvään läpi ajettiin pH 5,8:ssa tuoretta juustoheraa 20 pylvääntilavuutta (BV) eli 400 ml.

Käsittelyssä naudan insuliini poistui herasta 45 %:isesti. Proteiini-
 25 saanto käsittelyssä oli 93 % eli proteiiniin suhteutettuna insuliinipitoisuus oli alentunut 42 %.

Esimerkki 2

Naudan insuliinin poisto herasta adsorptiohartsilla XUS 40285.00
 pH-arvoissa 4, 5,8 ja 6,4.

30 XUS 40285.00 -adsorptiohartsia regeneroitiin 2 % NaOH:lla + 2 % HCl:lla ja huuhdeltiin neutraaliksi. Ravisteliin sijoitettuun Erlenmeyer-pulloon laitettiin tuoretta, pH-arvoon 4, 5,8 tai 6,4 säädettyä juustoheraa 145 ml ja 25 ml hartsia. 60 minuutin ravistelun jälkeen hartsi erotettiin herasta ja heran naudan insuliinipitoisuus määritettiin RIA:lla.

- Käsittelyssä naudan insuliini poistui pH 4,0:ssa 57 %:isesti, pH 5,8:ssa 71 %:isesti ja pH 6,4:ssä 58 %:isesti. Proteiinisaanto oli vastaavasti pH 4,0:ssa 69 %, pH 5,8:ssa 66 % ja pH 6,4:ssä 63 % eli proteiiniin suhteutettuna insuliinipitoisuus oli alentunut vastaavasti 39 %, 47 % ja 37 %.
- 5 Koe osoittaa, että naudan insuliinia voidaan poistaa herasta adsorptiohartsilla laajalla pH-alueella.

Esimerkki 3

Naudan insuliinin poisto herasta makrohuokoisella akryylipohjaisella adsorptiohartsilla Amberlite XAD 7.

- 10 XAD 7 -adsorptiohartsia regeneroitiin 4 % NaOH:lla + 0,09 % HCl:lla, huuhdeltiin neutraaliksi ja pakattiin 20 ml pylvääseen. Pylvään läpi ajettiin pH 6,4:ssä tuoretta juustoheraa 20 pylvääntilavuutta (BV) eli 400 ml.

- Käsittelyssä naudan insuliini poistui herasta 76 %:isesti. Proteiinisaanto käsittelyssä oli 90 % eli proteiiniin suhteutettuna insuliinipitoisuus oli alentunut
- 15 68 %.

Esimerkki 4

Naudan insuliinin poisto heraproteiinitivisteestä adsorptiohartsilla XUS 40285.00 pH:ssa 5,8.

- XUS 40285.00 -adsorptiohartsia regeneroitiin 4 % NaOH:lla + 0,09 %
- 20 HCl:lla, huuhdeltiin neutraaliksi ja pakattiin 20 ml pylvääseen. Pylvään läpi ajettiin mikrosuodatettua (1,4 mikrometriä) heraproteiinitivistettä (kuiva-aine 5 %, proteiinia 32 % kuiva-aineesta) 20 pylvääntilavuutta (BV) eli 400 ml pH 5,8:ssa. Käsittelyssä naudan insuliini poistui heraproteiinitivisteestä 46 %:isesti. Proteiinisaanto käsittelyssä oli 98 % eli proteiiniin suhteutettuna
- 25 insuliinipitoisuus oli alentunut 45 %.

Esimerkki 5

Naudan insuliinin poisto heraproteiinitivisteestä makrohuokoisella akryylipohjaisella adsorptiohartsilla Amberlite XAD 7.

- XAD 7 -adsorptiohartsia regeneroitiin 4 % NaOH:lla + 0,09 % HCl:llä,
- 30 huuhdeltiin neutraaliksi ja pakattiin 20 ml pylvääseen. Pylvään läpi ajettiin pH 6,4:ssä tuoretta heraproteiinitivistettä (proteiinipitoisuus 2 %) 20 pylvääntilavuutta (BV) eli 400 ml.

- Käsittelyssä naudan insuliini poistui heraproteiinitivisteestä 86 %:isesti. Proteiinisaanto käsittelyssä oli 85 % eli proteiiniin suhteutettuna
- 35 insuliinipitoisuus oli alentunut 73 %.

Esimerkki 6

Naudan insuliinin poisto rasvattomasta maidosta adsorptiohartsilla Amberlite XAD 7 pH:ssa 6,7.

XAD 7 -adsorptiohartsia regeneroitiin 4 % NaOH:lla + 0,09 % HCl:lla, 5 huuhdeltiin neutraaliksi ja pakattiin 20 ml pylvääseen. Pylvään läpi ajettiin rasvatonta maitoa (kuiva-aine 9 %, proteiinia 35 % kuiva-aineesta) 20 pylvääntilavuutta (BV) eli 400 ml pH 6,7:ssä.

Käsittelyssä naudan insuliini poistui 40 %:isesti proteiiniin suhteutettuna. Koe osoittaa, että myös maidosta naudan insuliinia saadaan 10 poistettua, mutta insuliinin poistumisaste oli heikompi kuin heraa käsiteltäessä.

Esimerkki 7

Naudan insuliinin poisto kaseiiniliuoksesta adsorptiohartsilla Amberlite XAD 7 pH:ssa 6,7.

XAD 7 -adsorptiohartsia regeneroitiin 4 % NaOH:lla + 0,09 % HCl:lla, 15 huuhdeltiin neutraaliksi ja pakattiin 20 ml pylvääseen. Pylvään läpi ajettiin natriumkaseinaattiliuosta (kuiva-aine 3 %, proteiinia 89 % kuiva-aines-ta) 20 pylvääntilavuutta (BV) eli 400 ml pH 6,7:ssä.

Käsittelyssä naudan insuliini poistui 50 %:isesti.

Esimerkki 8

20 Tuoretta juustoheraa otettiin 14 l ja sitä ultra- ja diasuodatettiin 40 °C:ssa GR81PP-kalvoilla (6 000 D cut-off -kalvot) Labstak-ultrasuodattimella konsentroitisuhteella 6, laimennettiin lähtötilavuuteen ja suodatettiin uudelleen konsentroitisuhteella 4. Siten kokonaiskonsentroitisuhteeksi tuli 24. Lähtöherasta ja loppuretentaattina saadusta heraproteiinitivisteestä määritettiin naudan 25 insuliinipitoisuus RIA:lla sekä proteiinipitoisuus. Lähtöherassa naudan insuliinia oli 21,2 ng/g proteiinia ja ultra- ja diasuodatuksen jälkeen saadussa heraproteiinitivisteessä insuliinia oli 14,8 ng/g proteiinia.

Ultra- ja diasuodatuksen vaikutuksesta naudan insuliinipitoisuus oli siten alentunut 30 % proteiiniin suhteutettuna.

Esimerkki 9

30 60 litraan vettä (50 °C) liuotettiin 5,040 kg esimerkin 1 mukaisesti käsitellystä herasta valmistettua heraproteiinijauhetta, 11,423 kg kasvirasvaseosta, 11,232 kg puhdistettua laktoosia, 12,260 kg maltodekstriiniä (DE 21), 135 g vitamiini- ja mineraaliesiseosta (sisältää A-, D-, E-, K-, B1-, B2-, B6- ja 35 B12-vitamiinit sekä niasiinin, foolihapon, pantoteenihapon, biotiinin, askorbiini-

hapon, koliinin, inositolin, ferroglykonaatin, sinkkisulfaatin, mangaanisulfaatin, natriumseleniitin ja kupariglykonaatin) sekä 70 g kalsiumkloridia, 300 g kalsiumfostaattia, 65 g magnesiumsulfaattia, 125 g natriumkloridia ja 620 g kaliumsitraattia. Seoksen kuiva-ainepitoisuus oli noin 40 %.

- 5 Näin saatu seos johdettiin homogenisaattoriin (150/50 bar) ja kuivattiin jauheeksi sumutuskuvaimella, jossa kuivauslämmöt olivat 180/75 °C, leijupedillä 70/120/30 °C. Tuote oli koostumukseltaan, ulkonäöltään ja maultaan tavallisen äidinmaidonkorvikkeen kaltaista.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä naudan insuliinin poistamiseksi lehmänmaidosta peräisin olevasta nestemäisestä rasvattomasta proteiinipitoisesta materiaalista, t u n n e t t u siitä, että

lehmänmaidosta peräisin oleva nestemäinen rasvaton proteiinipitoinen materiaali, jonka pH on 2 - 8, saatetaan lämpötilassa, joka on alle 65 °C, kosketukseen adsorptiohartsin kanssa, jolloin käsiteltävän proteiinipitoisen materiaalin painosuhde adsorptiohartsiin on korkeintaan 100:1,

johon hartsikäsittelyyn mahdollisesti yhdistetään ainakin yksi proteiinipitoisen materiaalin ultra- ja diasuodatuskäsittely, ja

näin saatu nestemäinen materiaali tarvittaessa konsentroidaan proteiinikonsentraatiksi ja mahdollisesti kuivataan jauheeksi.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lehmänmaidosta peräisin olevana nestemäisenä rasvattomana proteiinipitoisena materiaalina käytetään heraa, heraproteiiniitiivistettä, rasvatonta maitoa tai kaseiiniliuosta, edullisesti heraa.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että adsorptiohartsina käytetään styreeni- tai akryylipohjaista adsorptiohartsia, joka edullisesti on makrohuokoista.

4. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käsiteltävän proteiinipitoisen materiaalin painosuhde adsorptiohartsiin on sopivasti 10:1 - 40:1.

5. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että proteiinipitoinen materiaali johdetaan adsorptiohartsilla täytetyn pylvään läpi virtausnopeudella 1 - 20 pylvääntilavuutta (BV)/h, sopivasti 6 - 8 BV/h, lämpötilassa 2 - 30 °C, sopivasti 2 - 10 °C.

6. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että proteiinipitoinen materiaali saatetaan kosketukseen adsorptiohartsin kanssa lämpötilassa 2 - 30 °C, sopivasti 2 - 10 °C:ssa sekoitustila-
30 astiassa, jolloin kosketusaika lievässä sekoituksessa on alle 2 tuntia, sopivasti 60 minuuttia.

7. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lehmänmaidosta peräisin oleva nestemäinen rasvaton proteiinipitoinen materiaali ultra- ja diasuodatetaan käyttäen kalvoja, jotka ovat
35

5 000 - 25 000 D cut-off -kalvoja, ennen proteiinipitoisen materiaalin saattamista kosketukseen adsorptiohartsin kanssa ja/tai adsorptiohartsikäsitellyn jälkeen.

8. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 7 mukainen menetelmä, t u n -
5 n e t t u siitä, että ennen saattamista kosketukseen adsorptiohartsin kanssa lehmänmaidosta peräisin oleva nestemäinen rasvaton proteiinipitoinen materiaali esikäsitellään kirkastamalla se sopivasti mikrosuodattamalla, ultrasuodattamalla tai sentrifugoimalla, edullisesti suodattamalla se mikrosuodatuskalvojen läpi, jotka kalvot ovat 0,05 - 1,4 mikrometrin kalvoja, edullisesti 0,1 mikrometrin kalvoja.

9. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 8 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että adsorptiohartsilla käsitelty nestemäinen materiaali konsentroidaan ultra- ja diasuodatuksella käyttäen kalvoja, jotka ovat 5 000 - 25 000 D cut-off -kalvoja, sopivasti 10 000 D cut-off -kalvoja, proteiinkonsentraatiksi, joka mahdollisesti kuivataan jauheeksi, sopivasti sumutus- tai pak-
15 kaskuivauksella.

10. Oleellisesti naudaninsuliiniton, lehmän maidosta peräisin oleva rasvaton proteiinipitoinen materiaali, t u n n e t t u siitä, että se on valmistettu jonkin patenttivaatimuksista 1 - 9 mukaisella menetelmällä.

20 11. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 9 mukaisella menetelmällä saadun, oleellisesti naudaninsuliinittoman, lehmän maidosta peräisin olevan rasvattoman proteiinipitoisen materiaalin käyttö äidinmaidonkorvikkeen tai jonkin muun erityisravintovalmisteen proteiiniosana tai kulutusmaidon, muiden maitojuomien tai erilaisten maitovalmisteiden raaka-aineena.

25 12. Menetelmä oleellisesti naudaninsuliinittoman äidinmaidonkorvikkeen tai jonkin muun erityisravintovalmisteen tai kulutusmaidon, jonkin muun maitujuoman tai jonkin maitovalmisteen tai näiden raaka-aineen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että tuotteen valmistuksessa proteiiniosana käytetään jonkin patenttivaatimuksista 1 - 9 mukaisesti saatua, oleellisesti
30 naudaninsuliinitonta, lehmän maidosta peräisin olevaa rasvatonta proteiinipitoista materiaalia.

(57) Tiivistelmä

Keksinnön kohteena on menetelmä naudan insuliinin poistamiseksi lehmänmaidosta peräisin olevasta nestemäisestä rasvattomasta proteiinipitoisesta materiaalista, jolloin lehmänmaidosta peräisin oleva nestemäinen rasvaton proteiinipitoinen materiaali, jonka pH on 2 - 8, saatetaan lämpötilassa, joka on alle 65 °C, kosketukseen adsorptiohartsin kanssa, jolloin käsiteltävän proteiinipitoisen materiaalin painosuhte adsorptiohartsiin on korkeintaan 100:1, johon hartsikäsitelyyn mahdollisesti yhdistetään ainakin yksi proteiinipitoisen materiaalin ultra- ja diasuodatuskäsitely, ja näin saatu nestemäinen materiaali tarvittaessa konsentroidaan proteiinikonsentraatiksi ja mahdollisesti kuivataan jauheeksi. Lisäksi keksinnön kohteena on näin saatu, oleellisesti naudaninsuliiniton proteiinipitoinen materiaali ja sen käyttö proteiiniosana tai raaka-aineena oleellisesti naudaninsuliinittoman äidinmaidonkorvikkeen tai jonkin muun erityisravintovalmisteen tai kulutusmaidon, jonkin muun maitojuoman tai jonkin maitovalmisteen tai näiden raaka-aineen valmistamisessa.

